

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

In re application of : Takuo SAKAI  
Serial No. : 10/069,182  
Filed : May 22, 2002  
For : Process for Producing Plant-Origin Antibacterial Substance

**DECLARATION**

I, Ryoko KOBAYASHI, declare that I am acquainted with both the Japanese and English languages, that the English translation attached hereto is a true and accurate translation of Japanese Patent Application No. 2000-189614.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Signed at Osaka, Japan on this 1st day of December, 2005

Ryoko KOBAYASHI

**BEST AVAILABLE COPY**

**PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT**

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this office.

Date of Application: June 23, 2000

Application Number: Patent Application No. 2000-189614

Applicant: Takuo SAKAI

Date: October 12, 2005

Commissioner,  
Patent Office

**M a k o t o N A K A J I M A**

Certificate No. 2005-3085169

[Document Name]      Application for Patent  
[Sorting Number]      PTS-9461  
[Filing Date]          June 23, 2000  
[Addressee]      The Commissioner of the Patent Office  
[International Patent Classification]      C12S 3/00  
[Title of the Invention]          Process for Producing Plant-Origin  
   Antibacterial Substance  
[Number of claim(s)]      9  
[Inventor]  
    [Address]      4-13-6, Harayamadai, Sakai-shi, Osaka, Japan  
    [Name]      Takuo SAKAI  
[Applicant]  
    [Identification Number]      592047478  
    [Name]      Takuo SAKAI  
[Attorney]  
    [Identification Number]      100065248  
    [Patent Attorney]  
    [Name]      Shintaro NOGAWA  
    [Telephone Number]      06-6365-0718  
[Indication of Fee]  
    [Prepayment Register Number]      014203  
    [Amount]      21000  
[Item of attached Documents]  
    [Name of Item]      Specification      1  
    [Name of Item]      Drawings      1  
    [Name of Item]      Abstract of the Disclosure      1  
    [Number of the General Power of Attorney]      9721003  
[Proof]      Required

[NAME OF THE DOCUMENT] Specification

[TITLE OF THE INVENTION] Process for Producing Plant-Origin Antibacterial Substance

[CLAIMS]

[Claim 1] A process of producing an antibacterial substance derived from a plant, the process comprising disintegrating at least a part of tissue of the plant and releasing the antibacterial substance therefrom, the plant being optionally cut or ground to an appropriate size.

[Claim 2] The process according to claim 1, wherein the tissue of the plant is disintegrated with an enzyme capable of acting on protopectin to release a pectin substance.

[Claim 3] The process according to claim 2, wherein the enzyme is selected from the group consisting of protopectinases, polymethyl galacturonases, polygalacturonases, arabinases and rhamnogalacturonases.

[Claim 4] The process according to claim 2 or 3, wherein the enzyme is protopectinase F, S, L, T, C or N or polymethyl galacturonase-SX1.

[Claim 5] The process according to any one of claims 2 to 4, wherein the enzyme is used within a range from pH 2.0 to 10.0 at a temperature of 30 to 40°C.

[Claim 6] The process according to any one of claims 1 to 5, wherein the plant is selected from the group consisting of cabbage, garland chrysanthemum, mugwort, dandelion, dropwort, potato, onion, sweet potato, carrot, cotton and pumpkin.

[Claim 7] A bactericidal or bacteriostatic composition containing an antibacterial substance as set forth in claim 1 as an effective ingredient.

[Claim 8] The composition according to claim 7, which is used for food.

[Claim 9] The composition according to claim 8, wherein the food is bread, noodle, candies, cookies, soft drink, nourishing drink or jelly.

#### [DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION]

[0001]

##### [Technical Field of the Invention]

The present invention relates to a process of producing an antibacterial substance derived from a plant which includes disintegrating at least a part of tissue of the plant and releasing the antibacterial substance therefrom, and bactericidal or bacteriostatic compositions containing as an active ingredient the antibacterial substance obtained by the process.

[0002]

##### [Prior Art]

Microorganisms, especially bacteria which form spores (spore forming bacteria), often contaminate food and do great economic damage. Processed food and others are inviting targets for contamination by spore forming bacteria. If even one spore remains after sterilization of food, bacteria easily proliferate to damage the quality of the food significantly.

Among such spore forming bacteria, there exist those producing poisonous matters (cereus toxin, botulinum toxin) which may cause death incidents such as aerobic *Bacillus cereus* and anaerobic *Clostridium botulinum*.

Accordingly, the prevention and extermination of spore forming bacteria is an important problem to solve in the food industry. However, spore forming bacteria always exist in agricultural products which are raw materials, and often contaminate processed food.

[0003]

Unlike proliferative cells, bacterial spores can survive even under conditions which generally kill bacteria such as heat, organic solvents, dryness and the like. For example, the bacterial

spores do not die out when left in boiling water for 20 minutes, and they do not die out under a condition of 2 % or less moisture.

Accordingly, even food having been sterilized at high temperatures is often contaminated with spore forming bacteria. Furthermore, since spores are smaller than cells, they cannot be removed by bacteria elimination such as microfiltration in many cases. This is also a reason for difficult control of spore forming bacteria.

For the above reasons, various kinds of substances inhibiting proliferation of spore forming bacteria have been studied, but no substances have been found that are food-hygienically safe and effective.

[0004]

[Problems that the Invention is to Solve]

Tissue of plants of the higher orders is generally constructed of aggregates of cells, and pectins play an important part in this construction. In plant tissue, pectins bind via rhamnogalactan to cellulose or hemicellulose which constitutes cell walls, and then form so-called middle lamellae of multi-layered structure by chelate bond via a bivalent metal such as calcium to bond cells and form tissue.

Insoluble pectins in this form are referred to as protopectins, and enzymes which have the activity of acting on protopectins and freeing pectin substances are generally referred to as protopectinases (Fermentation and Industry: 37, 928-938, 1978; Agric.Biol.Chem., 52, 1091-1093, 1988; Agric.Biol.Chem., 53, 1213-1223, 1989; Agric.Biol.Chem., 54, 879-889, 1990; Eur.J.Biochem., 226, 285-291, 1994; Biosci.Biotech.Biochem., 58, 353-358, 1994). If protopectinases are allowed to act on plant tissue, cells are isolated to be single cells while water-soluble pectin substances are released.

[0005]

[Means for Solving the Problems]

Noting that dead plants are easily decomposed by bacteria while living plants are not contaminated by ordinary

bacteria except for plant pathogenic microbes, the inventor has studied on this biological mechanism, finally to find out that substances solubilized from middle lamellae together with pectins when protopectinases act on plants have the nature of inhibiting proliferation of bacteria. Thus the present invention has been accomplished.

According to the present invention, there are provided a process of producing an antibacterial substance from a plant which includes disintegrating at least a part of tissue of the plant and releasing the antibacterial substance, and a bactericidal or bacteriostatic composition containing as an active ingredient the antibacterial substance obtained by the process.

[0006]

[Mode for Carrying Out the Invention]

The plant used for the process of the present invention is not particularly limited, and may be a dicotyledon or a monocotyledon. As examples of dicotyledons, may be included Ranales (water lily, peony), Piperales (Houttuynia cordata, pepper), Cucurbitales (pumpkin, dishcloth gourd), Opuntiales (cactus), Rosales (cherry, pear, bean, strawberry, loquat, arrowroot), Rutales (mango, orange, lemon), Plantaginales (plantain), Umbelliflorae (dropwort, honewort, carrot), Asterales (Japanese butterbur, dandelions, edible burdock, garland chrysanthemum, mugwort), Polemoniales (potato, capsicum, tobacco, sesame, sweet potato), Rhoeadales (poppy, Chinese cabbage, cabbage, turnip, brassica), Malvales (cotton, gumbo) and the like. As examples of monocotyledons, may be mentioned Liliales (lily, garlic, onion), Arales (colocasis), Amaryllidales (welsh onion, Chinese chive), Iridales (iris, sweet flag), Dioscoreales (Chinese yam, yam), Agavales (agave), Orchidales (orchid), Graminales (rice, barley, the Korean lawn grass, cane, corn) and the like.

Any parts of these plants such as terrestrial stems, subterranean stems, leaves, roots, flowers, fruits and seeds may be used. For example, terrestrial stems and leaves of cabbage, garland chrysanthemum, mugwort, dandelion and dropwort, subterranean

stems of potato and onion, roots of sweet potato and carrot, flowers of cotton and fruits of pumpkin may be used.

The plants may be used as they are or after they are cut or ground into an appropriate size. However, in order to disintegrate plant tissue sufficiently, the plants may preferably be chipped into an appropriate size, for example, a square of about 0.5 to 1 cm. If the plants have sizes larger than this range, the plants may be ground by combining a mechanical means such as a Waring blender.

[0007]

The plants release antibacterial substances existing in intercellular spaces by being treated with an enzyme capable of separating plant cells into individual cells under stirring.

The enzyme may be any enzyme that can act on a protopectin to release a pectin substance. The enzyme may be used singly, or two or more kinds of enzymes may be combined for use.

Examples of enzymes that may be included protopectinases, polymethyl galacturonases, polygalacturonase, arabinases and rhamnogalacturonases. More particularly, protopectinase-F, protopectinase-S, protopectinase-L, protopectinase-T, protopectinase-C, protopectinase-N and polymethyl galacturonase SX1 may preferably be used.

[0008]

Treatment conditions may be selected as appropriate depending upon the kind of the enzyme and the kind and weight of the plant. In the case where a protopectinase or polymethyl galacturonase is used as an enzyme, the enzyme is added in an amount of 1,500 to 5,000 units, preferably 2,000 to 4,000 units with respect to 10 g (wet weight) of the plant. The treatment is carried out at 30 to 40 °C, ideally at about 37 °C for one to five hours.

The plant can be treated with the enzyme in acetate buffer, phosphate buffer, physiologic saline or water, within the range of pH2.0 to 10.0, preferably at pH 7.0, and especially it is preferable to carry out the treatment in the acetate buffer. If the weight of the



plant is equal, the finer the plant is cut, the sooner the antibacterial substance is released.

[0009]

The liquid obtained after the above-described treatment with the enzyme may be used as it is. Alternatively, the liquid may be made into a supernatant partially purified by conventional filtration and centrifugation or into an isolated liquid or solid product by further filtration and purification, if desired.

For purification, various means usually used such as cation exchanger resins, ammonium sulfate precipitation using ammonium sulfate of 80 % concentration, gel filtration using dextran gel, polyacrylamide gel or agarose gel and the like may be used singly or in optional combination, though the antibacterial substances contained in the liquids treated with the enzyme do not necessarily have similar structures depending upon the plants from which the antibacterial substances are derived.

For example, in the case where a cation exchanger resin is used for a column method, CM-cellulose, Amberlite, CM-Sephadex and CM-TOYOPEARL may be used as resins. In the case of a liquid containing the antibacterial substance obtained by treating sweet potato with protopectinase-S, the supernatant is passed through a column fed with CM-TOYOPEARL buffered with phosphate buffer (pH 7.0) in order that the antibacterial substance is adsorbed, and further a 0.6 M aqueous solution of sodium chloride is passed through the column to elute and separate the antibacterial substance

[0010]

According to the tests conducted by the present inventor, the antibacterial substances obtained by the above-described method have antibacterial activity against spore forming bacteria typified by bacilli and clostridia and also have antibacterial activity against koji mold of Aspergilli. From this, it is considered that the antibacterial substances suppress the proliferation of spore forming bacteria and koji mold by the action of inhibiting germination of spores.

Accordingly, the antibacterial substances of the present invention can be used for bactericidal or bacteriostatic compositions in various preparations such as aqueous liquid preparations, aerosols, solid preparations (powder, granule) and the like. As ideal carriers for these preparations include carriers known in the field of art such as water, starch, wheat flour, sucrose, glucose, lactose and the like.

The antibacterial substances of the present invention can be used for preventing food from decaying by being mixed with or sprayed on various kinds of food such as bread, noodles, candies, cookies, soft drinks, nourishing drinks and jellies in process or at the final step in the form of the above-mentioned preparations. Also the antibacterial substances can be used as products of other industrial fields in the fields of feed, quasi drugs and the like.

[0011]

Thus, since the antibacterial substances of the present invention can be produced from raw material plants which have been eaten as vegetables, fruit vegetables, medical herbs and others since ancient times, it is specially mentioned that the antibacterial substances can be utilized as means for preventing and exterminating spore forming bacteria by being added to food without causing adverse effects on human beings.

Further, since any parts of plants can be used as materials in the production process and as materials for the antibacterial agents according to the present invention, agricultural products substandard for market as well as cooking scraps are effectively used. Therefore, the invention will make extremely great contributions to society, including the prevention of environmental contamination due to waste food and the creation of new merchandizes, and its economical effect will be unexpectedly great.

[0012]

[Examples]

The present invention is now explained with reference to examples, which should not be construed to limit the scope of the invention.

### Example

An onion (a subterranean stem), 10g (wet weight), was chopped into 0.5 to 1 cm squares and suspended in 10 mL of 100 mM acetate buffer (pH 7). The enzymes shown in Table 1, 4,000 units, were added to the resulting suspension, followed by stirring at 37 °C for 5 hours (the activity of the enzymes was determined in accordance with Sakai's method in *Methods in Enzymology*, Academic Press, vol.161, pp..335 to 350). As a result, the tissue of the onion was disintegrated and a liquid was produced which contained single cells and intracellular substances.

This liquid was filtered with a 20-mesh cloth filter of nylon to obtain a filtrate, which was centrifuged at 2,000g for 5 minutes to completely remove insoluble substances. The anti-bacterial activity of the resulting supernatant was determined by a modification of the cylinder plate method (*Antibiotics Handbook*, edited by Kazumaro ICHINO and Hiroshi MUROYA, published by Sangyo Tosho, page 181; *Summary of Antibiotics*, written by Nobuo TANAKA and Shoshiro NAKAMURA, Tokyo University Publishing Association, page 24). More particularly, the supernatant, 50 µL, was fed in 6 mm diameter holes made on a flat plate of a potato dextrose agar medium (Nissui Seiyaku Kabushiki Kaisha) inoculated with spores of *Bacillus subtilis*, allowed to stand at 15 °C for three hours, and then kept at 37 °C for 24 hours to allow *Bacillus subtilis* to proliferate. The diameter of proliferation inhibition circles formed around the holes was measured to determine the antibacterial activity against *Bacillus subtilis*.

The antibacterial activity was determined to be one unit when the diameter of the proliferation inhibition circle minus the diameter of the hole, i.e., 6 mm, was 1 cm. The antibacterial activity of the enzymes was calculated with use of the enzymes alone and the buffer alone as controls.

The results of this experiment are shown in Table 1.

[0013]

[Table 1]

Enzymes Used	Antibacterial Activity (unit/mL)
Protopectinase F <sup>1)</sup>	43.0
Protopectinase-S <sup>1)</sup>	44.2
Polymethyl galacturonase-SX1 <sup>2)</sup>	41.0
Protopectinase-L <sup>1)</sup>	44.3
Protopectinase-T <sup>3)</sup>	21.3
Protopectinase-N <sup>4)</sup>	45.1
Controls	0

1) T. Sakai, Methods in Enzymology, Vol. 161, 335-350, 1988, Academic Press

2) T. Sakai et al., FEBS Letters, Vol. 414, 439 - 443, 1997

3) M. Sakamoto et al., Eur.J.Biochem., Vol. 226, 285 - 291, 1994

4) T. Sakai et al., Adv.Appl.Microbiol., Vol. 36, 213 - 294, 1993

[0014]

With the controls, *Bacillus subtilis* grew immediately around the holes, while bacteria did not grow around the holes into which the enzyme-treated supernatants were fed. It was confirmed that the supernatants had remarkable antibacterial activities. Therefore, it is clear that this method can produce a substance inhibiting the growth of *Bacillus subtilis* from onion (See Fig. 1).

[0015]

#### Example 2

Various species of plants weighting 3g chopped into pieces of 0.5 to 1 cm square were suspended in 10 mL of 100 mM acetate buffer pH7 containing protopectinase-S (500 units). The resulting suspensions were stirred at 37 °C for an hour and then were centrifuged in the manner described in Example 1. The antibacterial activity of the supernatants against *Bacillus subtilis* was determined in the same manner as described in Example 1. The antibacterial activity was recognized with all the plants as shown in Table 2.

[0016]

[Table 2]

Plants used (parts)	Antibacterial Activity (unit/mL)
Sweet potato (root)	47.0
Pumpkin (fruit)	49.3
Cabbage (terrestrial stem and leaves)	61.2
Garland chrysanthemum (terrestrial stem and leaves)	34.0
Carrot (root)	60.2
Potato (subterranean stem)	61.2
Onion (subterranean stem)	44.2
Mugwort (terrestrial stem and leaves)	34.0
Dandelion (terrestrial stem and leaves)	18.1
Dropwort (terrestrial stem and leaves)	22.5
Cotton (flowers)	11.5
Control (enzyme alone)	0

[0017]

These results clearly show that antibacterial substances exist widely in plants and that plants can be used as materials for antibacterial substances regardless of species and parts (see Fig. 2).

[0018]

### Example 3

Various species of plants (parts used were the same as in Example 2) were chopped into pieces of 1 to 2 cm square and suspended in 100 mM acetate buffer pH7, and then were completely ground at 5 °C using a Waring blender. The supernatants obtained by removing insoluble substances by centrifugation were tested for their antibacterial activity against bacillus subtilis in the same manner as in Example 1.

The results show that the plants had the antibacterial activity as shown in Table 3.

[0019]

[Table 3]

Plants used	Antibacterial Activity (unit/mL)
Sweet potato	7.0
Pumpkin	5.3
Cabbage	11.2
Garland chrysanthemum	13.0
Carrot	6.5
Potato	7.3
Onion	34.2
Mugwort	24.2
Control (enzyme alone)	0

[0020]

Thus, it was proved that not only liquids obtained by disintegrating plant tissue with enzymes but also liquids of ground plants obtained by mechanical technique contained antibacterial substances.

[0021]

#### Example 4

The activity of liquids containing antibacterial substances prepared from a pumpkin (fruit) and a sweet potato (root) according to the process of Example 1 using protopectinase-S were determined with regard to the microorganisms shown in Table 4.

[0022]

[Table 4]

Microorganisms	Antibacterial activity (Activity of sweet potato extract against <i>Bacillus subtilis</i> is assumed to be 100)	
	Sweet potato ex.	Pumpkin ex.
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	100	290
<i>Bacillus cereus</i> IFO 3001	113	283
<i>Bacillus alvei</i> IFO 14175	110	300
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3528	98	267
<i>Bacillus pumilus</i> IFO 3030	132	301
<i>Bacillus megaterium</i> AKU 212	121	305
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> IFO 14141	30	51
<i>Bacillus circulans</i> IFO 33239	32	48
<i>Bacillus coagulans</i> IFO 12583	30	56
<i>Bacillus firmus</i> IFO 3330	38	55
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 14206	28	42
<i>Bacillus macerans</i> IFO 3490	42	68
<i>Bacillus natto</i> IFO 3013	56	80
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 3625	81	230
<i>Aspergillus awamori</i> IFO 4033	11	25

[0023]

Table 4 clearly shows that the antibacterial substances produced by the process of the present invention inhibit the growth not only of *Bacillus subtilis* but also of bacteria belonging to *Bacillus* family and bacteria belonging to *Aspergillus* family, and therefore can be used as antibacterial agents.

[0024]

#### Example 5

Sweet potato, 900g, chopped into pieces of about 1 cm square were suspended in a 100 mM phosphate buffer pH 7. Protopectinase-S, 200,000 units, was added to the resulting suspension and the resulting mixture was allowed to react at 37 °C for five hours with stirring. The tissue of the sweet potato was completely disintegrated to produce single cells and intercellular liquid.

The single cells in the treated liquid were removed according to Example 1 to give a supernatant containing 60,000 units of an antibacterial substance.

[0025]

[Effect of the invention]

According to the present invention, there are provided a process of producing an antibacterial substance derived from a plant, the process including releasing the antibacterial substance by disintegrating at least part of tissue of the plant and a bactericidal or bacteriostatic composition containing, as an effective ingredient, the antibacterial substance obtained by this process.

The antibacterial substance can prevent contamination by spore forming bacteria which has been difficult so far. Also since a wide variety of plants can be used as materials for the antibacterial substance regardless of their species or parts, safe antibacterial substances can be obtained economically.

[Brief Description of the Drawings]

[Fig. 1]

Fig. 1 shows results of a proliferation inhibition test of a supernatant of onion which is single-celled by treatment with protopectinase-S against *Bacillus subtilis*. A halo observed around a hole for placing a liquid to be tested indicates the inhibition of proliferation.

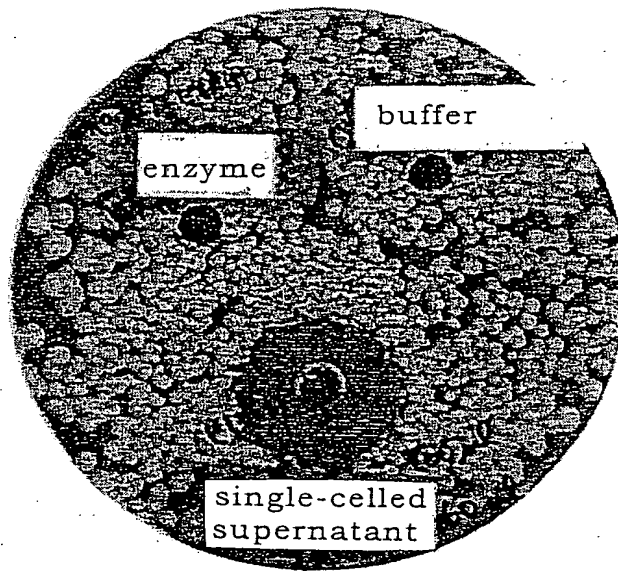
[Fig. 2]

Fig. 2 shows an example of a proliferation inhibition test of a plant extract treated with protopectinase-S against *Bacillus subtilis*.

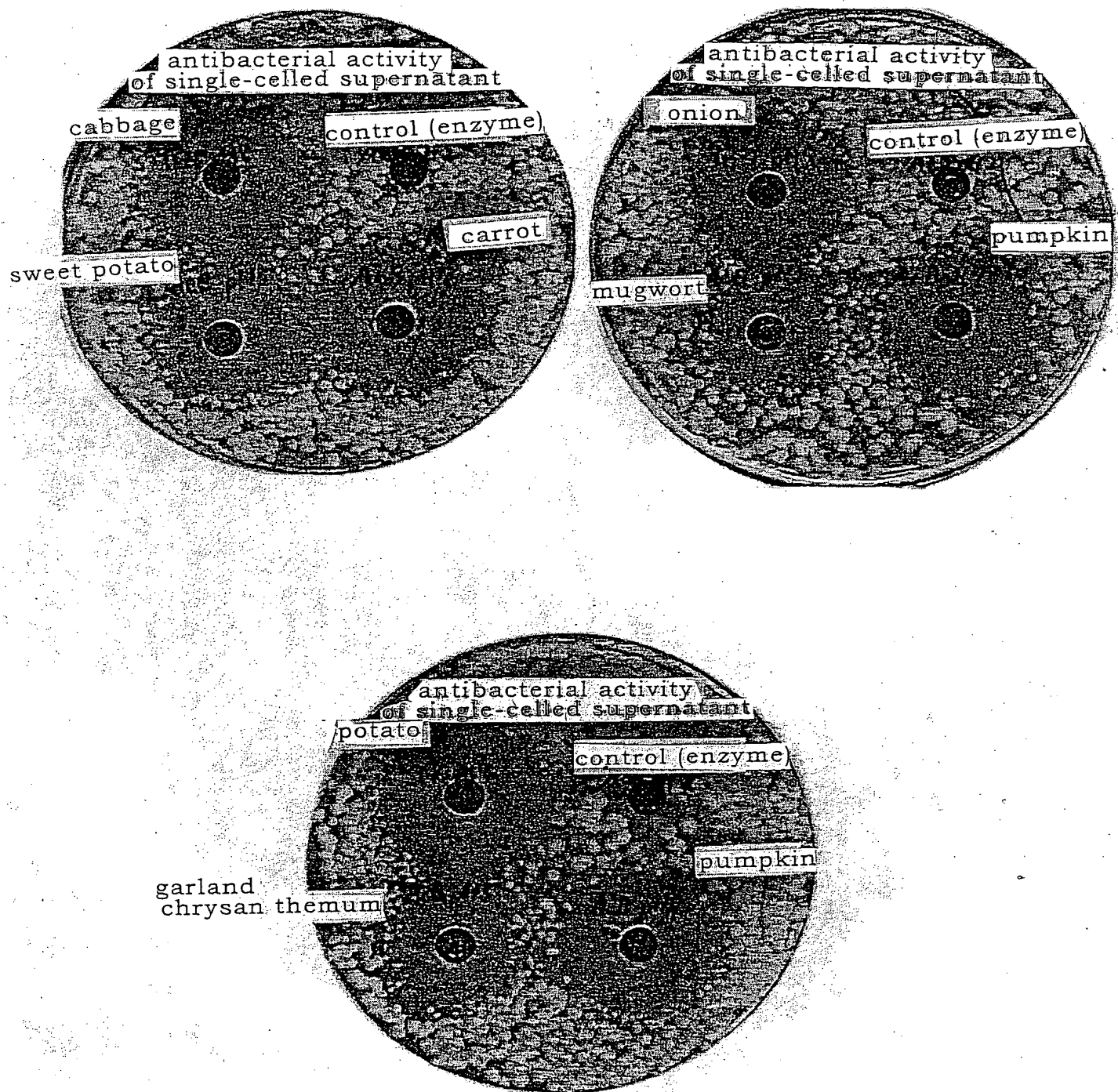


[NAME OF THE DOCUMENT] Drawings

[Fig.1]



[Fig. 2]



[NAME OF THE DOCUMENT] Abstract

[ABSTRACT]

[Problems that the Invention is to Solve] An object is to provide substances inhibiting proliferation of spore forming bacteria.

[Means for Solving the Problems] According to the present invention, there are provided a process of producing an antibacterial substance from a plant which includes disintegrating at least a part of tissue of the plant and releasing the antibacterial substance, and a bactericidal or bacteriostatic composition containing as an active ingredient the antibacterial substance obtained by the process.

[SELECTED FIGURE] None

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

T. Sakae  
101069.182  
filed 05-22-2002  
BSKB, LLP  
(703) 205-8000  
0397-0441P  
1 of 1

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2000年 6月23日

出願番号  
Application Number: 特願2000-189614

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
may be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

J P 2000-189614

出願人  
Applicant(s): 坂井 拓夫

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2005年10月12日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

中嶋



【書類名】 特許願

【整理番号】 PTS-9461

【提出日】 平成12年 6月23日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12S 3/00

【発明の名称】 植物由来抗菌物質の製造方法

【請求項の数】 9

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪府堺市原山台 4 丁 1 3 番 6 号

    【氏名】 坂井 拓夫

【特許出願人】

    【識別番号】 592047478

    【氏名又は名称】 坂井 拓夫

【代理人】

    【識別番号】 100065248

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 野河 信太郎

    【電話番号】 06-6365-0718

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 014203

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

    【包括委任状番号】 9721003

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物由来抗菌物質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 植物体を適当な大きさに切断もしくは破碎するかせずして、植物組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物質を遊離させることからなる、植物由来の抗菌物質の製造方法。

【請求項 2】 植物組織の崩壊が、プロトペクチンに作用してペクチン物質を遊離させうる酵素によって行われる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記酵素が、プロトペクチナーゼ類、ポリメチルガラクトクロナーゼ類、ポリガラクトクロナーゼ類、アラビナーゼ類及びラムノガラクトクロナーゼ類からなる群から選択される請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】 前記酵素が、プロトペクチナーゼ F、S、L、T、C もしくは N またはポリメチルガラクトクロナーゼ-SX1 である請求項 2 又は 3 に記載の方法。

【請求項 5】 前記酵素が、pH2.0～10.0 の領域で 30～40℃ で用いられる請求項 2～4 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 6】 植物体が、キャベツ、キクナ、ヨモギ、タンポポ、セリ、ジャガイモ、タマネギ、サツマイモ、ニンジン、ワタ及びカボチャからなる群から選択される請求項 1～5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 7】 請求項 1 による抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌組成物。

【請求項 8】 食品に使用される請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】 食品がパン、麺、餡、クッキー、清涼飲料、栄養飲料又はゼリーである請求項 8 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物体の組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物質を遊離させることからなる植物由来の抗菌物質の製造方法、及びこの方法で得られた抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌組成物に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

微生物、特に、芽胞を形成する細菌（芽胞菌）は、しばしば食物を汚染し大きな経済的被害をもたらす。加工食品等は芽胞菌が汚染する格好の対象物で、殺菌後に一個でも芽胞が残存すると容易に増殖して食品の品質を著しく損傷する。

また、芽胞菌の中には、好気性のバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) や嫌気性の芽胞菌であるクロストリジウム・ボツリナム (*Clostridium botrinum*) のように毒素（セレウス毒素、ボツリヌス毒素）を生産して死亡事故を引き起こすものが存在する。

したがって、芽胞菌防除は食品産業にとって解決すべき大きな課題となっているが、食品の原料である農作物には常に芽胞菌が存在し、それらの加工品の中に混入する場合が少なくない。

**【0003】**

その上、細菌の芽胞は細胞とは異なり、熱、有機溶媒、乾燥など、一般に細菌を死滅させる条件でも生存する。たとえば、それらは沸騰水中で20分間放置しても死滅せず、水分2%以下の条件でも死滅することはない。

したがって、高温・高圧で滅菌処理した食品でも、芽胞菌による汚染がしばしば見られる。さらに、芽胞は細胞に比べて小さいので、精密濾過のような除菌処理で除去できない場合が多く、これも芽胞菌の防除が困難な理由となっている。

こうしたことから、芽胞菌の増殖を阻止する物質が種々検討されているが、食品衛生上安全で有効な物質は見出されていない。

**【0004】****【発明が解決しようとする課題】**

一般に、高等植物の組織は細胞の集合体で構成されているが、この構成にペクチンが重要な役割を果たしている。ペクチンは、植物組織の中ではラムノガラクトンを介して細胞壁を構成するセルロースやヘミセルロースと結合し、さらに、これらが、カルシウムなど2価の金属を介したキレート結合によって、重層構造の、いわゆるミドルラメラを構成して細胞を粘結し、組織を形成している。

この形態の不溶性ペクチンをプロトペクチンといい、プロトペクチンに作用し

てペクチン物質を遊離させる活性を持つ酵素はプロトペクチナーゼと総称されている(発酵と工業：37, 928-938, 1978; Agric.Biol.Chem., 52, 1091- 1093, 1988; Agric.Biol.Chem., 53, 1213-1223, 1989; Agric.Biol.Chem., 54, 879-889, 1990; Eur.J.Biochem., 226, 285-291, 1994; Biosci.Biotech.Biochem., 58, 353-358, 1994)。植物組織にプロトペクチナーゼを作用させると、水溶性のペクチン物質の遊離とともに個々の細胞が単離される単細胞化が起こる。

#### 【0 0 0 5】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者は、枯死した植物体は微生物によって容易に分解されるのに対し、生命活性のある植物体は、植物病原菌を例外にして、一般の微生物には汚染されないことに着目し、その生物学的仕組みを研究した結果、プロトペクチナーゼを植物体に作用させた際にペクチンとともにミドルラメラから可溶化される物質が、微生物の増殖を阻害する性質を有することを見出し、この発明を完成した。

したがって、本発明によれば、植物組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物質を遊離させることからなる植物由来の抗菌物質の製造方法、及びこの方法で得られた抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌組成物が提供される。

#### 【0 0 0 6】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の方法が適用される植物体は、特に限定されず、双子葉植物及び単子葉植物などのいずれでもよい。双子葉植物としては、キンポウゲ目(スイレン、ボタン)、コショウ目(ドクダミ、コショウ)、ウリ目(ウリ、カボチャ、ヘチマ)、サボテン目(サボテン)、バラ目(サクラ、ナシ、マメ、イチゴ、ビワ、クズ)、ミカン目(マンゴー、ミカン、レモン)、オオバコ目(オオバコ)、セリ目(セリ、ミツバ、ニンジン)、キク目(フキ、タンポポ、ゴボウ、キクナ、ヨモギ)、ハナシノブ目(ジャガイモ、トウガラシ、タバコ、ゴマ、サツマイモ)、ケシ目(ケシ、ハクサイ、キャベツ、カブラ、アブラナ)、アオイ目(ワタ、オクラ)、単子葉植物としては、ユリ目(ユリ、ニンニク、タマネギ)、サトイモ目(サトイモ)、ヒガンバナ目(ネギ、ニラ)、アヤメ目(アヤメ、ハナショウブ)、ヤマノイモ目(ナガイモ、ヤマノイモ)、リュウゼツラン目(リュウゼツラン)、ラン目(ラン)、イネ



目(イネ、ムギ、シバ、サトウキビ、トウモロコシ)などが挙げられる。

これらの植物体は、地上茎、地下茎、葉、根、花、果実、種子のいずれの部分であってもよく、例えばキャベツ、キクナ、ヨモギ、タンポポ、セリでは地上茎と葉、ジャガイモ、タマネギでは地下茎、サツマイモとニンジンでは根、ワタでは花、カボチャでは果実の部分を使用することができる。

また、植物体はそのまま用いてもよいし、適当な大きさに切断もしくは破碎して用いてもよい。しかし、植物組織を十分に崩壊させるには、適当な大きさ、例えば0.5~1cm程度の角に植物体を細断することが好ましく、この範囲より大きい場合には、ワーリングブレンダーのような機械的手法との組み合わせによって破碎してもよい。

#### 【0007】

植物体は、植物細胞を単細胞化する酵素と攪拌下で処理されることによって、細胞間隙中に存在する抗菌物質を遊離する。

酵素は、プロトペクチンに作用してペクチン物質を遊離させることができるものであればよく、1種のための使用でも、2種以上の組み合わせでの使用であってもよい。

一例として、酵素は、プロトペクチナーゼ類、ポリメチルガラクトクロナーゼ類、ポリガラクトクロナーゼ類、アラビナーゼ類及びラムノガラクトクロナーゼ類が挙げられ、具体的にはプロトペクチナーゼ-F、プロトペクチナーゼ-S、プロトペクチナーゼ-L、プロトペクチナーゼ-T、プロトペクチナーゼ-C、プロトペクチナーゼ-N又はポリメチルガラクトクロナーゼ-SX1を用いることが好ましい。

#### 【0008】

処理条件は、酵素の種類及び植物体の種類や重量などによって適宜選択される。プロトペクチナーゼ又はポリメチルガラクトクロナーゼを用いる場合には、植物体(湿量)10gあたりに15,00~5,000単位、好ましくは20,00~4,000単位の酵素を添加して、30~40℃、好ましくは約37℃で1~5時間処理される。

酵素と植物体は、pH2.0~10.0の範囲、好ましくはpH7.0の酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、生理食塩水又は水中で処理することができ、特に酢酸緩衝液中で処理することが好ましい。なお、植物体の重量が同程度であれば、その植物体が細断さ

れているほど、短時間で抗菌物質が遊離される。

#### 【0009】

上記のような酵素処理後に得られた液体は、そのまま用いてもよく、また従来法による濾過と遠心分離で部分的に精製した上澄液、あるいは望ましい場合にはさらに濾過又は精製処理することによって液体又は固体の単離生成物とすることができる。

精製法としては、酵素処理液に含有される抗菌物質は、その由来原料によって構造が必ずしも同一ではないが、陽イオン交換樹脂、80%濃度の硫酸を用いる硫酸沈澱、デキストランゲル、ポリアクリルアミドゲル又はアガロースゲルによるゲル濾過など、通常用いられる種々の方法の一つ又は任意の組み合わせを利用することができる。

例えば、陽イオン交換樹脂をカラム法に用いる場合は、樹脂としてCM-セルロース、Amberlite、CM-Sephadex、CM-TOYOPEARLを用いることができる。サツマイモをプロトペクチナーゼ-Sで処理した抗菌物質含有液では、上澄液を、リン酸緩衝液(pH7.0)で緩衝化したCM- TOYOPEARLを充填したカラムに通塔して吸着させ、さらに0.6M食塩水溶液を通塔させて抗菌物質を溶出し、分離することができる。

#### 【0010】

本発明者の試験によれば、上記の方法により得られる抗菌物質は、バチルス属及びクロストリジウム属に代表される芽胞菌に抗菌活性を有するほか、アスペルギルス(*Aspergillus*)属のコウジ菌にも抗菌活性を示す。このことから、この抗菌物質は孢子の発芽形成を阻害するなどの作用によって、芽胞菌ならびにコウジ菌の増殖を抑制すると考えられる。

したがって、本発明にかかる抗菌物質は、水性液剤、噴霧剤又は固形剤(粉末剤、顆粒剤)などの形態で殺菌又は静菌組成物として使用することができ、これらの剤形に用いられる担体としては、水、澱粉、小麦粉、ショ糖、ブドウ糖、乳糖など当該分野で公知の担体が挙げられる。

本発明の抗菌物質は、上記のような適当な剤形で、各種の食品、例えばパン、麺、餡、クッキー、清涼飲料、栄養飲料、ゼリー状菓子の製造工程、又は最終製品に混合又は噴霧するなどして、食品の腐敗防止に用いることができる。また、

他の分野の製品として、飼料、医薬部外品などの分野でも利用が可能である。

#### 【0011】

このように、本発明にかかる抗菌物質は、野菜、果菜、薬草などとして古くから食用となってきた植物体を原料にして製造できるので、人体に悪影響を及ぼすことなく、食品に添加して芽胞菌を防除する手段として利用できる点で特筆される。

さらに、本発明の製造方法及び抗菌物質の原料として利用される植物体の部分は限定されないため、規格外で商品にならなかった農産物や調理くずなどの有効利用を図ることができ、食品廃棄物による環境汚染の防止、新規商品の創出など、社会に貢献するところは極めて大きく、その経済効果は計り知れないものがある。

#### 【0012】

##### 【実施例】

以下、実施例を挙げて説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### 実施例

タマネギ(地下茎部分)10g(湿重)を0.5~1cm角に細断して10 mlの100 mM酢酸緩衝液(pH 7)に懸濁し、これに、表1に記載の酵素 4,000単位(酵素の活性は、坂井の方法、Methods in Enzymology、Academic Press、161 巻、335~350 ページの記載によって測定した)を添加して37℃で5時間攪拌した。その結果、タマネギの組織は崩壊して、単細胞と細胞間隙物質を含んだ溶液が生成した。

この液体を20メッシュのナイロン製濾布で濾過して濾液を得、これを 2000gで5 分間遠心分離し、不溶性物質を完全に除去して得られた上澄液の抗菌活性を円筒平板法(抗生物質ハンドブック、市野一磨、室屋博共編、産業図書、181ページ;抗生物質大要、田中信男、中村昭四郎共著、(財)東京大学出版会、24ページ)の変法によって測定した。すなわち、この上澄液50 $\mu$ l をバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)の孢子を播種したポテトデキストロース寒天培地(日水製薬株式会社製)の平板に作った直径6 mmのホールに満たして15℃で3 時間放置した後、37℃で24 時間保温してバチルス・サブチリスを増殖させ、ホールの

周辺に形成した生育阻止円の直径を測定してバチルス・サブチリスに対する抗菌活性を検定した。

なお、阻止円の直径からホールの直径6 mm を引いた値が1cmの場合を1単位とし、酵素のみのもの及び緩衝液のみのものを対照として活性を算出した。

この実験の結果を表1に示す。

【0013】

【表1】

使用酵素	抗菌活性 (単位/ml)
プロトペクチナーゼ-F <sup>1)</sup>	43.0
プロトペクチナーゼ-S <sup>1)</sup>	44.2
ポリメチルガラクトースナーゼ-SX1 <sup>2)</sup>	41.0
プロトペクチナーゼ-L <sup>1)</sup>	44.3
プロトペクチナーゼ-T <sup>3)</sup>	21.3
プロトペクチナーゼ-N <sup>4)</sup>	45.1
対照	0

1) T. Sakai, Methods in Enzymology, Vol. 161, 335-350, 1988, Academic Press.

2) T. Sakai ら, FEBS Letters, Vol. 414, 439-443, 1997.

3) M. Sakamoto ら, Eur. J. Biochem., Vol. 226, 285-291, 1994.

4) T. Sakai ら, Adv. Appl. Microbiol., Vol. 36, 213-294, 1993.

【0014】

対照では、ホールのすぐ周囲にバチルス・サブチリスが生育していたが、酵素処理した上澄液を加えたホールの周囲では菌が生育しておらず、上澄液が、いずれも著しい抗菌活性を有することが認められた。したがって、この方法でタマネギからバチルス・サブチリスの生育を阻止する物質を製造できることが明らかである（図1参照）。

【0015】

## 実施例2

プロトペクチナーゼ-S (500単位) を含むpH7の100 mM 酢酸緩衝液10mlに0.5～1 cm角に細断した種々の植物体 3gを懸濁し、37℃で1 時間攪拌した。この処理

液を実施例 1 に示す方法で遠心分離し、その上澄液のバチルス・サブチリスに対する抗菌活性を実施例 1 と同様な方法で検定したところ、表 2 に示すように、すべての植物体に抗菌活性が認められた。

【 0 0 1 6 】

【表 2】

使用植物(部分)	抗菌活性(単位/ml)
サツマイモ(根)	47. 0
カボチャ(果実)	49. 3
キャベツ(地上茎と葉)	61. 2
キクナ(地上茎と葉)	34. 0
ニンジン(根)	60. 2
ジャガイモ(地下茎)	61. 2
タマネギ(地下茎)	44. 2
ヨモギ(地上茎と葉)	34. 0
タンポポ(地上茎と葉)	18. 1
セリ(地上茎と葉)	22. 5
ワタ(花)	11. 5
対照(酵素のみ)	0

【 0 0 1 7 】

この結果から、抗菌物質が広く植物体に存在することが明らかとなり、抗菌物質の原料として、種類及び部分を問わず植物を利用できることが明らかとなった(図 2 参照)。

【 0 0 1 8 】

### 実施例 3

各種の植物体(使用部分は実施例 2 に同じ)を 1~2 cm 角に細断して 100 mM 酢酸緩衝液 (pH7) に懸濁し、これを 5℃ でワーリングブレンダーを用いて完全に破碎し、遠心分離によって不溶物を除去して得た上澄液のバチルス・サブチリスに対する抗菌活性を、実施例 1 の方法で測定した。

その結果、表 3 に示すようにいずれの植物体にも抗菌活性が確認された。

【 0 0 1 9 】

【表 3】

使用植物	抗菌活性(単位/ml)
サツマイモ	7.0
カボチャ	5.3
キャベツ	11.2
キクナ	13.0
ニンジン	6.5
ジャガイモ	7.3
タマネギ	34.2
ヨモギ	24.2
対照(酵素のみ)	0

## 【0020】

このように、植物組織を酵素で崩壊させて得られる液体のみでなく、機械的手法によって得られた植物体の破碎液も抗菌物質を含有することが立証された。

## 【0021】

実施例 4

カボチャ(果実)とサツマイモ(根)からプロトペクチナーゼ-Sを用いて実施例 1の方法で調製した抗菌物質含有液の活性を、表 4 に示す微生物について検定した。

。

## 【0022】

【表 4】

微生物	抗菌活性 (サツマイモ抽出液のバチルス・サブチリスに対する活性を 100 とする)	
	サツマイモ抽出液	カボチャ抽出液
バチルス・サブチリス IFO 3134 ( <i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134)	100	290
バチルス・セレウス IFO 3001 ( <i>Bacillus cereus</i> IFO 3001)	113	283
バチルス・アルベイ IFO 14175 ( <i>Bacillus alvei</i> IFO 14175)	110	300
バチルス・スフェリカス IFO 3528 ( <i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3528)	98	267
バチルス・プミルス IFO 3030 ( <i>Bacillus pumilus</i> IFO 3030)	132	301
バチルス・メガテリウム AKU 212 ( <i>Bacillus megaterium</i> AKU 212)	121	305
バチルス・アミロリクエファシエンス IFO 14141 ( <i>Bacillus amyloliquefacience</i> IFO 14141)	30	51
バチルス・サーキュランス IFO 3329 ( <i>Bacillus circulans</i> IFO 33239)	32	48
バチルス・コアグランス IFO 12583 ( <i>Bacillus coagulans</i> IFO 12583)	30	56
バチルス・ファームス IFO 3330 ( <i>Bacillus firms</i> IFO 3330)	38	55
バチルス・リケニフォルミス IFO 14206 ( <i>Bacillus licheniformis</i> IFO 14206)	28	42
バチルス・マセランス IFO 3490 ( <i>Bacillus macerans</i> IFO 3490)	42	68
バチルス・ナットウ IFO 3013 ( <i>Bacillus natto</i> IFO 3013)	56	80
クロストリジウム・アセトブチリクム ATCC 3625 ( <i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 3625)	81	230
アスペルギルス・アワモリ IFO 4033 ( <i>Aspergillus awamori</i> IFO 4033)	11	25

## 【0023】

表 4 から明らかなように、本法で製造した抗菌物質はバチルス・サブチリスのみならず、広くバチルス属細菌の増殖を阻害するとともに、アスペルギルス属細菌の増殖を阻害し、抗菌剤としての利用が可能であることが明確になった。

## 【0024】

## 実施例 5

約1cm 角の立方体に細断したサツマイモ 900 g を100 mM リン酸緩衝液 (pH 7) に懸濁し、200,000単位のプロトペクチナーゼ-S を添加して攪拌しつつ37℃で 5 時間反応させたところ、サツマイモの組織は完全に崩壊して単細胞と細胞間液を生成した。

処理液中の単細胞を実施例 1 に準じて除去し、60,000単位の抗菌物質を含有する上澄液を得た。

#### 【0 0 2 5】

##### 【発明の効果】

本発明によれば、植物体の組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物質を遊離させることからなる植物由来の抗菌物質の製造方法、及びこの方法で得られた抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌組成物が提供される。

この抗菌物質は、特に、従来困難であった芽胞菌の汚染を防御することができる。また、抗菌物質の原料として、種類や部分を問わず、広く植物体を利用できるので、安全な抗菌物質を経済的に得ることができる。

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

タマネギをプロトペクチナーゼ-Sで処理した単細胞化上澄液のバチルス・サブチリスに対する増殖阻害テストの結果である。検定液を注入するホールの周辺に見られるハ口が、増殖阻止を示している。

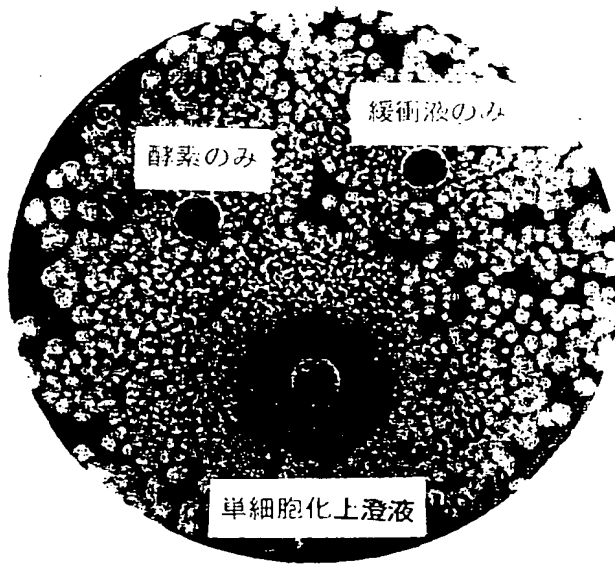
##### 【図 2】

プロトペクチナーゼ-Sで処理した植物抽出液のバチルス・サブチリスに対する増殖阻害テストの一例。

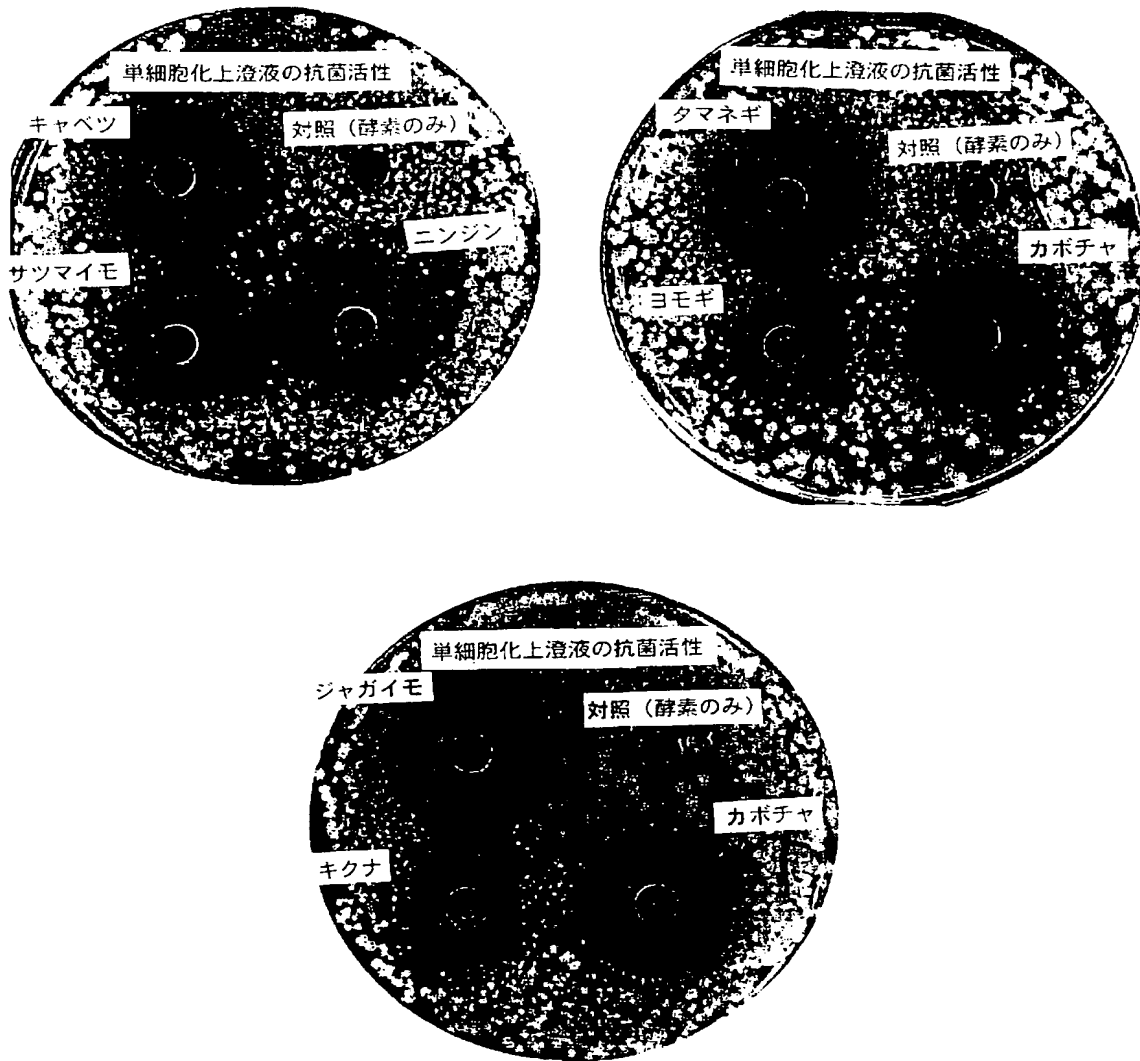


【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 芽胞菌の増殖を阻止する物質の創製を目的とする。

【解決手段】 本発明によれば、植物体の組織の少なくとも一部を崩壊させて抗菌物質を遊離させることからなる植物由来の抗菌物質の製造方法、及びこの方法で得られた抗菌物質を有効成分として含有する殺菌又は静菌組成物が提供される。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 0 - 1 8 9 6 1 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 9 2 0 4 7 4 7 8 ]

1. 変更年月日

1 9 9 2 年 3 月 2 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府堺市原山台 4 丁 1 3 番 6 号

氏 名

坂井 拓夫

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**